

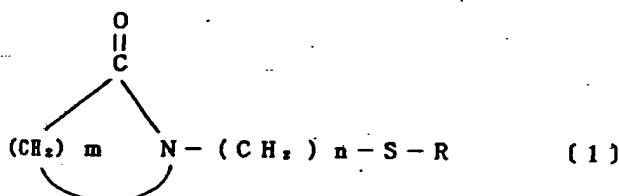


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 A61K 37/24, 47/22, 47/26 A61K 9/107		A1	(11) 国際公開番号 WO 93/05805
		(43) 国際公開日 1993年4月1日(01.04.1993)	
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平3/236193 1991年9月17日(17.09.91) JP	PCT/JP92/01179 1992年9月16日(16.09.92)	下園雄治 (SHIMOZONO, Yuji) [JP/JP] 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町786番地の1 Saga, (JP) 真子孝文 (MANAKO, Takafumi) [JP/JP] 〒841-02 佐賀県三養基郡中原町大字原古賀592番地の7 Saga, (JP) (74) 代理人 弁理士 小林和憲 (KOBAYASHI, Kazunori) 〒170 東京都豊島区北大塚2丁目25番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), KR, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) 久光製薬株式会社 (HISAMITSU SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山本仲行 (YAMAMOTO, Nakayuki) [JP/JP] 〒410-22 静岡県田方郡函南町柏谷90番地の5 Shizuoka, (JP) 杉本道彦 (SUGIMOTO, Michihiko) [JP/JP] 〒410 静岡県沼津市五月町1番地の16 Shizuoka, (JP) 守本成紀 (MORIMOTO, Seiki) [JP/JP] 〒410-22 静岡県田方郡函南町仁田23番地の7 Shizuoka, (JP) シャトーグエルツ305 Shizuoka, (JP) 梶原秀夫 (SAKAKIBARA, Hideo) [JP/JP] 〒411 静岡県三島市中273番地の12 Shizuoka, (JP/JP) 斉田 勝 (SAITA, Masaru) [JP/JP] 〒841-02 佐賀県三養基郡基山町小倉855番地の75 Saga, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : EMULSION CONTAINING PARATHYROID HORMONE FOR PERNASAL ADMINISTRATION

(54) 発明の名称 バラチロイドホルモン類含有経鼻投与用乳剤

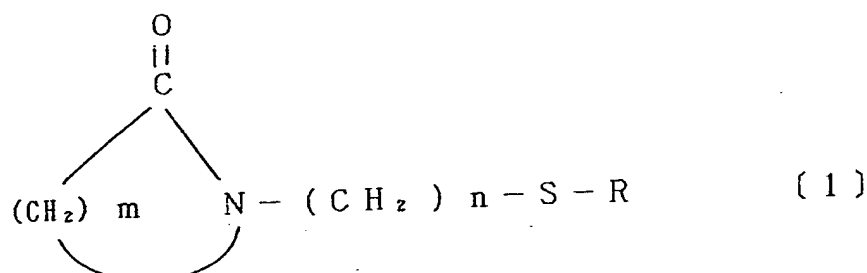


(57) Abstract

An emulsion for pernasal administration containing a parathyroid hormone as the active ingredient, at least one member selected among azacycloalkane derivatives represented by general formula (I), glycyrrhizic acid and nontoxic salts thereof, and a suitable amount of water. In formula (I), R represents alkyl, m represents an integer of 2 to 4, and n represents an integer of 1 to 15, provided that R represents C₅ to C₁₁ alkyl when n is 1 to 3. It can provide a well-absorbable and highly stable preparation.

(57) 要約

パラチロイドホルモン類を有効成分とし、少なくとも吸収促進剤として下記一般式〔1〕



(式中、Rはアルキル基、mは2～4の整数、nは1～15の整数を示す。但しnが1～3の場合にはRは炭素数が5～11のアルキル基を示す。)

で表されるアザシクロアルカン誘導体、グリチルリチン酸またはその無毒性塩および適宜な水を含むことを特徴とするパラチロイドホルモン類含有経鼻投与用乳剤とすることにより、吸収性が良好でかつ安定性の高い製剤を得るものである。

附録としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FI	フィンランド	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GA	ガボン	NL	オランダ
BE	ベルギー	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BR	ブラジル	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SD	スーダン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CH	スイス	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SN	セネガル
CM	カメルーン	LK	スリランカ	SU	ソヴェエト連邦
CS	チェコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TD	チャード
CZ	チェコ共和国	MC	モナコ	TG	トーゴ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	UA	ウクライナ
DK	デンマーク	ML	マリ	US	米国
ES	スペイン	MN	モンゴル		

明 細 書

パラチロイドホルモン類含有経鼻投与用乳剤

技術分野

本発明はパラチロイドホルモン (Parathyroid Hormone; PTH) 類を有効成分とする経鼻投与用乳剤に係わり、特に乳剤の安定性に優れかつ鼻腔内に噴霧投与することにより安全でしかも効率よく PTH 類が吸収されるように改良した上記経鼻投与用乳剤に関する。

従来の技術

生理活性ペプチド類は将来の薬物治療薬として、最も急速な進歩を遂げる分野の 1 つになりつつある。しかしながら、ペプチド薬物の現行の投与経路はほとんど注射剤に限られており、特に慢性疾患治療において病院への通院の煩わしさと注射部位の疼痛および苦痛を軽減させるためにも、より簡便であり自己投与可能な投与剤が所望されている。

最近注射に代わる投与経路として、直腸、鼻腔、口腔などの粘膜吸収が研究されてきた。薬物単独ではほとんど吸収されないペプチド類も界面活性作用を有する物質の添加により、吸収促進されることが分かり、多くの吸収促進剤が見いだされてきた。例えば生理活性ペプチド類の鼻腔内投与に関する報告として、吸収促進剤としてグリコデオキシコール酸ナトリウムなどの界面活性剤を用いたインシュリンの水溶液の経鼻投与法が知られている (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, No. 21, 7419-7423, (1985))。またコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸などの胆汁酸を用いたポリペプチド類の経鼻投与法が知られている (特開昭 63-2932 号公報)。さらに生理活性ペプチド類と水吸収性でかつ水

難溶性の基剤からなる粉末経鼻投与剤も知られている（特開昭60-224616号公報）。しかしこれらを応用した製剤は、吸収性あるいは局所刺激性の点で十分とは言えず、いまだ実用化されるに至っていない。

一方、生理活性ペプチド類の中で、PTH類は血清カルシウム上昇作用を有するペプチドホルモンとして一般に知られており、副甲状腺機能低下症の診断などに用いられている。しかしながら、PTH類は親水性が高くまた分子量が大きな（約4,000から10,000）ペプチドであり消化管からの吸収は極めて困難である。

発明が解決しようとする課題

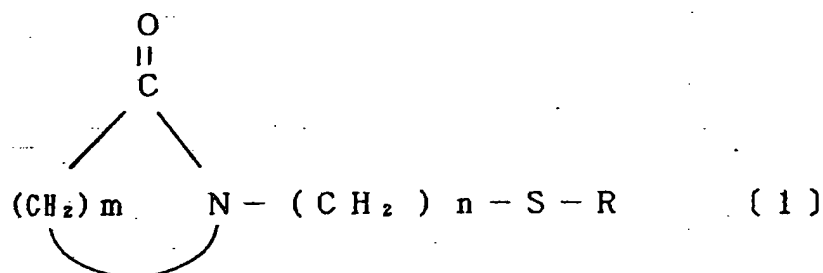
ところで、特開昭62-238261号公報にはアザシクロアルカン誘導体が優れた吸収促進作用をもつことが記載されている。該誘導体は、上記した従来の経鼻投与剤に用いた吸収促進剤とは物性を異にし、非常に強力な吸収促進作用を有することが明らかになった。したがってこれを吸収促進剤として用いてPTH類経鼻投与剤を製剤化した。アザシクロアルカン誘導体は油状物質であって、エマルジョン化する必要がある、そのエマルジョン化に必要な乳化剤が従来のものでは不十分で満足できるものが得られなかった。また近年少なくとも水と油とを均一にした液剤である乳化に関する数多くの研究がなされ、多数の乳化剤が開発され、また乳化技術の進歩もめざましく、非常に安定なエマルジョンが広く利用されてきているが、その多くは、ポリオキシエチレン鎖を含有する非イオン性界面活性剤、あるいはイオン性界面活性剤が乳化剤として利用され、人体に対する安全性に懸念がもたれているものが多い。さらに、静脈注射用脂肪乳剤等に汎用されている乳化剤として卵黄レシチン、大豆レシチンがあるが、これらは室温における安定性が悪く、均一

性にも多くの問題点がある。

本発明は上記の問題点に対処してなされたもので、PTH類の経鼻投与剤において吸収促進剤としてアザシクロアルカン誘導体を使用した場合の安定性のよいエマルジョン製剤を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段及び作用

本発明者らは上記エマルジョン製剤に適した乳化剤を研究した結果、可溶化力の弱いと思われていたグリチルリチン酸またはその無毒性塩が意外にもHCO-60、ツィーン80のような非イオン性界面活性剤よりも強力で、吸収促進剤としてアザシクロアルカン誘導体を使用したPTH類経鼻投与剤のエマルジョン化に極めてよく適し、安定で均一微細な粒子のエマルジョンが得られることを見出し、PTH類の良好な吸収性を示す経鼻投与用乳剤を得るに至った。すなわち本発明は、PTH類を有効成分とし、少なくとも吸収促進剤として下記一般式〔1〕



(式中、Rはアルキル基、mは2～4の整数、nは1～15の整数を示す。但しnが1～3の場合にはRは炭素数が5～11のアルキル基を示す。)で表されるアザシクロアルカン誘導体、グリチルリチン酸またはその無毒性塩および適宜な水を含有することを特徴とするPTH類含有経鼻投与用乳剤に関する。

まず本発明の有効成分であるPTH類とは血清カルシウム上昇作

84個のアミノ酸配列を有し、天然型PTHまたはその類似体が知られている。例えばヒトPTH (h-PTH) (1-84) [Biochemistry 17, 5723 (1978)]、h-PTH (1-38) [特開昭57-81448号公報]、h-PTH (1-34) [Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 415 (1974)]、h-PTH (1-34) NH₂ [特開昭58-96052号公報]、[Nie 8, 18] h-PTH (1-34)、[Nie 8, 18, Tyr 34] h-PTH (1-34) [特開昭55-113753号公報]、[Nie 8, 18] h-PTH (1-34) NH₂ [特開昭61-24598号公報]、[Nie 8, 18, Tyr 34] h-PTH (1-34) NH₂ [特開昭60-34996号公報]、ラットPTH (1-84) [J. Biol. Chem., 259 (5), 3320 (1984)]、ラットPTH (1-34) [Endocrinol., 117 (3), 1230 (1985)]、ウシPTH (1-84) [Am. J. Med., 50, 639 (1971)]、ウシPTH (1-34)、ウシPTH (1-34) NH₂ [Pthobiology annual 11, 53 (1981)]等が挙げられ、好適には分子量約4,400の34個のアミノ酸配列を有するh-PTH (1-34)である。本発明のPTH類含有経鼻投与用乳剤中のPTH類濃度は通常製剤1ml当たり10~10,000単位であり、より好ましくは100~1000単位である。

本発明において吸収促進剤として使用されるアザシクロアルカン誘導体は油状物質であって、前記一般式〔1〕で示されるものであり、特開昭62-238261号公報に記載されている。一般式〔1〕のRについてさらに具体的に説明すると、アルキル基とはメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、

テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル等の直鎖状および分枝状アルキル基である。そのうち最も好適な吸収促進剤は、一般式〔1〕におけるRが炭素数10の直鎖状アルキル基、mが3、nが2で表わされる1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オン(油状物)である。本発明における上記アザシクロアルカン誘導体の添加量は、製剤中0.01%~10%(W/V)濃度であり、さらに好ましくは0.1%~5%(W/V)濃度である。

さらに本発明で用いられるグリチルリチン酸またはその無毒性塩は天然の甘草から抽出される成分として知られ、化粧品また甘味剤として食品添加物に幅広く用いられている。

グリチルリチン酸またはその無毒性塩としては、例えばグリチルリチン酸、グリチルリチン酸ジカリウム、グリチルリチン酸モノアンモニウム、グリチルリチン酸二ナトリウム、グリチルリチン酸三ナトリウムなどがそれぞれ挙げられ、特にグリチルリチン酸ジカリウムが好適である。上記グリチルリチン酸またはその無毒性塩の添加量は、製剤中0.1%以上であればよく、通常製剤中0.1%~5%(W/V)濃度であり、さらに好ましくは0.5%~2%(W/V)濃度である。

本発明における適宜な水の量とは、前記の本発明の有効成分であるPTH類、吸収促進剤のアザシクロアルカン誘導体および乳化剤のグリチルリチン酸またはその無毒性塩が、それぞれ前記した濃度となるようにしたときの、残量として適宜な量である。

経鼻投与製剤は一般に噴霧あるいは点鼻に適するように水性液であることが便利である。本発明の乳剤は、少なくとも上記の油状物質であるアザシクロアルカン誘導体とグリチルリチン酸またはその無毒性塩とが前記した製剤濃度となるように適宜な量の水を用い

て全容量を調製すればよく、本発明にいう乳剤とは、上記の油状物であるアザシクロアルカン誘導体と水とによって得られる微視的にエマルジョンを形成したものであって、肉眼的に乳白色および無色透明の均一な場合の液体を意味する。またそのpHは5から7であり、また生理食塩水に対する浸透圧比は1付近に調整されるのが好ましい。pH 5～7に調整あるいは維持するためにpH調整剤として水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩酸、硫酸あるいは適当な緩衝剤、例えば酢酸、乳酸、クエン酸、リン酸緩衝液等を加えることができる。また乳剤の浸透圧比を1付近に調整するために等張化剤としてグリセリンが好ましく、その他塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトール、ブドウ糖等必要に応じて添加することができる。

経鼻投与乳剤には防腐剤を添加してもよく、治療学上許容され得る防腐剤が一般に用いられる。例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、フェニルエチルアルコール、塩化ベンザルコニウム、フェノール、チメロサル、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。防腐剤の適切な濃度は、選択された防腐剤の種類によって多少の差があるが、一般に0.02%～2%(W/V)である。

経鼻投与乳剤の製造法としては自体公知の手段にしたがって任意の順序で各成分を混合して乳化することにより製造することができる。本発明乳剤を製造するためには、例えばグリチルリチン酸ジカリウム、h-PTH(1-34)および本発明に係る上記添加物に適宜な量の注射用蒸留水を加え加温、攪拌しながら溶解した後、水酸化ナトリウムまたは塩酸等のpH調整剤を加えて所定のpHに調整する。そして吸収促進剤であるアザシクロアルカン誘導体を加えた後、乳化機を用いて通常の方法により乳化することができる。例

例えばバイオミキサー（日本精機製作所）を用いて10,000～20,000rpm、10分間攪拌することにより均一分散した0.1～0.3 μ mの微細な粒径を持つエマルションを得ることができる。さらに超音波乳化機、コロイドミル等を用いて製造することができる。またh-PTH（1-34）は乳剤を調製した後、加え溶解して得てもよい。そこで乳化して得られた均一なh-PTH（1-34）含有エマルション製剤は例えば0.22 μ mのメンブランフィルターにより無菌濾過され、例えばバイアル瓶に充填して製品にするかまたは適宜凍結乾燥製剤として調製してもよい。

本発明の乳剤の投与量は、投与目的により種々異なるが、例えば人において定量噴霧器（0.05～0.1ml／ストローク）を用いて、1～2日1～3回を片方ないし両鼻孔に噴霧することにより確実に投与することができる。

本発明のPTH類含有経鼻投与用乳剤は通常スプレー噴霧装置によって霧状となして鼻腔内に投与し、全身作用を目的とする。また本発明の製剤は鼻粘膜の広範囲に付着させることにより確実に粘膜を透過して全身にPTH類を分布させることができる。したがって本発明のPTH類含有経鼻投与用乳剤はPTH類の投与対象疾患のある患者に対して注射投与による疼痛と苦痛等の問題点がなく且つ自己投与が可能である。

図面の簡単な説明

第1図は本発明製剤および対照製剤の経鼻投与後および筋肉注射剤投与後のラットにおける血漿中の平均h-PTH（1-34）濃度の経時変化を示したものである。

実施例

以下に実験例、実施例を示して、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実験例 1 乳剤の安定性

(1) 実験方法

アザシクロアルカン誘導体中の 1 - [2 - (デシルチオ) エチル] アザシクロペンタン-2-オンを選んで以下の 3 種類の乳化剤を用いて乳化力および乳剤の安定性を調べた。

- ① グリチルリチン酸ジカリウム (丸善化成)
- ② HCO-60 (日光ケミカルズ)
- ③ ツィーン 80 (日光ケミカルズ)

各試験管 (10 ml) に 1 - [2 - (デシルチオ) エチル] アザシクロペンタン-2-オンを 0.1 g 採り、あらかじめ 0.1 % ~ 5.0 % (W/V) を溶解した 3 種の水溶液または無添加溶液を各々 5.0 ml 入れ、バイオミキサー (日本精機製作所) により 1500 rpm で 1 分間攪拌して乳剤溶液を調製した。調製直後および室温 3 日間静置後の分散等の状況を観察した。また調製直後の濁度を 650 nm における吸光度により測定して乳化力の指標にした。

(2) 実験結果

結果を第 1 表 ~ 第 3 表に示した。表から明らかなように本発明のグリチルリチン酸ジカリウムを用いた場合は 0.1 % ~ 5 % において少なくとも良好な乳化を示し、4 % ~ 5 % においては完全溶解している状態である。またコントロールとしてグリチルリチン酸ジカリウム無添加の場合調製後ただちに二相に分離した。さらに室温 3 日後の乳剤の安定性を観察した結果、低濃度の HCO-60、ツィーン 80 で調製した乳剤において二相分離が観察された。一方乳化力の指標である濁度は HCO-60、ツィーン 80 に比較して同一

濃度ではいずれもグリチルリチン酸ジカリウムの方が低く乳化力が強いことを示している。それらの結果よりグリチルリチン酸ジカリウムは医薬品の添加物として多く汎用されている乳化剤であるHCO-60およびツィーン80に比較して乳化力および乳剤の安定性に著しく優れていることが分かった。

第1表 グリチルリチン酸ジカリウムを用いた場合

濃 度 %	調製直後 の 観 察	3 日 静 置 後 の 観 察	濁 度 (6 5 0 n m) *
5 . 0	無色透明	無色透明	0 . 0 0 6
4 . 0	無色透明	無色透明	0 . 0 0 6
3 . 0	白色透明	白色透明	0 . 3 4 6
2 . 0	白色透明	白色透明	0 . 4 0 5
1 . 0	白色透明	白色透明	0 . 4 3 7
0 . 5	白色透明	白色透明	0 . 4 5 9
0 . 1	白色乳化	白色乳化	1 . 2 8 4
無添加	二相分離	二相分離	—

* 濁度 (6 5 0 n m)

0 ~ 0 . 1 : 無色透明

0 . 1 ~ 1 . 0 : 白色透明 (透かして背後が見える状態)

1 . 0 ~ : 白色乳化 (市販牛乳程度の乳化状態)

第2表 ツイーン80を用いた場合

濃度 %	調製直後の観察	3日静置後の観察	濁度 (650nm)*
5.0	白色透明	白色透明	0.172
4.0	白色透明	白色透明	0.165
3.0	白色透明	白色透明	0.244
2.0	白色透明	白色透明	0.803
1.0	白色乳化	白色乳化分離	1.119
0.5	白色乳化	白色乳化分離	2.619

*濁度(650nm)

0～0.1 : 無色透明

0.1～1.0 : 白色透明(透かして背後が見える状態)

1.0～ : 白色乳化(市販牛乳程度の乳化状態)

第3表 HCO-60を用いた場合

濃度 %	調製直後の観察	3日静置後の観察	濁度 (650nm) *
5.0	白色透明	白色透明	0.317
4.0	白色透明	白色透明	0.425
3.0	白色透明	白色透明	0.712
2.0	白色透明	白色透明	0.915
1.0	白色乳化	白色乳化一部分離	2.829
0.5	白色乳化	白色乳化一部分離	2.877

* 濁度 (650nm)

0 ~ 0.1 : 無色透明

0.1 ~ 1.0 : 白色透明 (透かして背後が見える状態)

1.0 ~ : 白色乳化 (市販牛乳程度の乳化状態)

実験例 2 アザシクロアルカン誘導体添加濃度に及ぼす乳剤の安定性

(1) 実験方法

あらかじめ蒸留水に溶解した1% (W/V) グリチルリチン酸ジカリウム溶液5mlを8本の10ml試験管に各々分注し、アザシクロアルカン誘導体中の1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタシ-2-オンを選んで0~10%濃度になるように加えた後、バイオミキサー (日本精機製作所) により (15,000rpm) 1分間攪拌して乳剤を調製して直後および室温3日および7日静置後の分散等の状況を観察した。

(2) 実験結果

結果を第4表に示した。第4表から明らかなように本発明の1%グリチルリチン酸ジカリウムに対して、アザシクロアルカン誘導体中の1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オンを0.01~10%濃度範囲において少なくとも良好な乳化を示した安定な乳剤を得ることができた。

第4表 1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オン添加濃度に及ぼす乳剤の安定性

濃度 %	調製直後の観察	3日静置後の観察	7日静置後の観察
10.0	白色乳化	白色乳化	白色乳化
5.0	白色乳化	白色乳化	白色乳化
2.0	白色透明	白色透明	白色透明
1.0	白色透明	白色透明	白色透明
0.5	無色透明	無色透明	無色透明
0.1	無色透明	無色透明	無色透明
0.01	無色透明	無色透明	無色透明
0	無色透明	無色透明	無色透明

実験例 3 ラットにおける吸収実験

(1) 経鼻投与用PTH類含有組成物の調製

(a) 製剤A

本発明のPTH類含有経鼻用乳剤を以下の調製により得た。あらかじめ80℃蒸留水にパラオキシ安息香酸メチルおよびパラオキシ

安息香酸プロピルを溶解して調製したパラベン溶液 80 ml に、グリセリン 2.2 g、グリチルリチン酸ジカリウム 1 g を加え攪拌溶解した後、1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オンを 1 g 添加し、1 N 水酸化ナトリウムにて pH 5.5 に調整して全量を上記パラベン溶液にて 100 ml にしてから、バイオミキサー（日本精機製作所：ABM 型）を用いて 15,000rpm、3 分間攪拌乳化して乳剤を得た。さらに h-PTH (1-34)（比活性 3,300 単位/mg ※；酢酸テリパラチド；東洋醸造社製）0.607 mg を上記で得られた乳剤 10 ml に溶解して、以下の組成を含む組成物を得た。

経鼻投与用乳剤 1 ml 当り

- | | | |
|---|------------------------------------|---------------|
| ① | h-PTH (1-34) | 200 単位 |
| ② | 1-[2-(デシルチオ)エチル]
アザシクロペンタン-2-オン | 10 mg |
| ③ | グリチルリチン酸ジカリウム | 10 mg |
| ④ | グリセリン | 22 mg |
| ⑤ | パラオキシ安息香酸メチル | 1.2 mg |
| ⑥ | パラオキシ安息香酸プロピル | 0.3 mg |
| ⑦ | 水酸化ナトリウム | 適量 pH 5.5 に調整 |
| ⑧ | 注射用蒸留水 | 全量 1 ml とした。 |

※ PTH 活性測定法を以下に説明する。

(ア) PTH レセプターの調製

SD 系雄ラット（体重 200～250 g）を断頭、放血し、開腹後、腎を摘出し、その表面被膜を取り除き、腎皮質部分を切り取り、氷冷する。以下の操作はできるだけ低温（0～4℃）下で行う。上記の腎皮質部分を 0.25 M シュクロースおよび 1 mM EDTA 含有 10 mM トリス塩酸塩緩衝液（pH 7.5）（以下 A 液と称す）

中に浸し、テフロンベッスルを用いたガラス外套管で腎皮質をその湿重 (g) の3倍容量 (ml) のA液を加えてホモゲナイズする。このホモジネートを $150 \times G$ 、10分間遠心分離し、その上清をさらに $2200 \times G$ 、15分間遠心分離する。上清を捨て、沈殿物の上層の乳濁色の部分をA液に懸濁し、この懸濁液を $25000 \times G$ 、15分間遠心分離により洗浄し、再び懸濁して容器に分注し、 -70°C で凍結して -20°C で保存する。

(イ) PTHとPTHレセプターの反応

被検品を $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように ATP $\text{P-Mg } 2 \text{ mM}$ 、 MgCl_2 10 mM 、 $\text{KCl } 60 \text{ mM}$ 、 $\text{GTP } 20 \mu\text{M}$ 、イソブチルメチルキサンチン 1 mM 、クレアチンホスフェート 8 mM および牛血清アルブミン (BSA) 0.2% 含有 100 mM トリス塩酸塩緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) (以下B液と称す) に溶かし、これを酢酸テリパラチド標準品*についても行う。

これら4つの溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつガラス試験管に分注し、各々8本ずつ用意する。試料は氷水中に保ち、ATPなど他の物質の分解を抑える。 -20°C に保存したPTHレセプター調製品を室温で解凍し、A液にあらかじめ溶かしておいたクレアチンキナーゼを加え、さらにA液でクレアチンキナーゼ $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ 、PTHレセプター調製品蛋白量 $1.4 \text{ mg}/\text{ml}$ になるように調製し、氷冷中で保つ。上記の分注された試料溶液を 37°C の恒温槽に数分間つけた後に、上記のPTHレセプタークレアチンキナーゼ液を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で10分間インキュベートする。次いで、 0.1 M 酢酸緩衝液 ($\text{pH } 4.0$) $100 \mu\text{l}$ を加え、直ちに氷水中につけた後、速やかに試験管を沸騰水で1分間熱し、反応を停止させる。

(ウ) 生成C-ATPの測定

上記の反応停止試料を蒸留水で10～30倍に希釈し、 $2000 \times$

G、15分間の遠心分離により除蛋白を行う。その上清のC-A T P量をRIAキット（ヤマサ醤油社製）で測定する。

（エ）PTH力値の測定

C-A T Pの測定値をPM/mg PTHレセプター蛋白/分の単位に換算し、これを反応の値とし、標準品によって得られた値に大して被検品を平行線検定2×2点法を用いて検定する。

＊）酢酸テリパラチドの活性は、酢酸テリパラチド標準品を基準にしてラット腎皮質細胞膜を用いる生物学的測定法により測定し、酢酸テリパラチド単位で表示される。酢酸テリパラチド単位とは、上記に示した測定法によりウシ副甲状腺ホルモン（1-84）の標準品（WHOより提供された200国際単位/アンブル；WHO 67/342）をもとにして酢酸テリパラチド標準品の相対活性をもとめたところ3300単位/mgであったことより、この酢酸テリパラチド標準品を3300酢酸テリパラチド単位/mgとして表したものである。

（b）対照製剤B

本発明と比較するため、1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オンを含有しないPTH類含有経鼻用比較液剤を以下の調製により得た。

あらかじめ80℃蒸留水に溶解して調製したパラベン溶液80mlに、グリセリン2.2g、グリチルリチン酸ジカリウム1gを加え攪拌溶解した後、1N水酸化ナトリウムにてpH5.5に調整した後、全量をパラベン溶液にて100mlにした。

またさらにh-PTH(1-34)（比活性3300単位/mg）0.607mgを上記で得られた乳剤10mlに溶解して、以下の組成を含む組成物を得た。

経鼻投与用乳剤 1 ml 当り

①	h-P T H (1 - 3 4)	2 0 0 単位
②	グリチルリチン酸ジカリウム	1 0 m g
③	グリセリン	2 2 m g
④	パラオキシ安息香酸メチル	1 . 2 m g
⑤	パラオキシ安息香酸プロピル	0 . 3 m g
⑥	水酸化ナトリウム	適量 p H 5 . 5 に調整
⑦	注射用蒸留水	全量 1 m l とした。

(2) ラットにおける h - P T H (1 - 3 4) 製剤の経鼻投与実験

17時間絶食させた体重 2 0 0 ~ 2 5 0 g のウィスター系雄性ラットを一群 3 匹として実験に供した。実験投与 2 0 分前にペントバルビタール (5 0 m g / k g) を腹腔内投与して麻酔したのち、平井らの方法 (Int. J. Pharm. 9 . 1 6 5 (1 9 8 1)) にしたがってまず頸部を切開し、気管にポリエチレンチューブを挿入し、切開部を接着剤にて閉じておき、マイクロシリンジを用いて外鼻孔より h - P T H (1 - 3 4) 2 0 単位 / 0 . 1 m l / k g を投与し、ただちに、外鼻孔を接着剤にて閉じた。

採血は投与前 5 分と投与後 5、10、20、30、45 分および 1 時間、1 . 5 時間、2 時間毎に経時的に大腿静脈より 0 . 2 5 ml ずつ採血し、1 5 0 0 0 r p m、5 分間遠心分離後、その血漿を測定を行うまで - 3 0 ° C に凍結保存した。血漿中の h - P T H (1 - 3 4) 濃度測定は I N S - P T H キット (ニコルス社製) を用いた R I A (2 抗体法) にて行った。

(3) 実験結果

第 1 図に上記製剤 A および対照製剤 B の経鼻投与 (2 0 単位 / k g) 後の、血中 h - P T H (1 - 3 4) 濃度を示した。なお比較のため、

筋肉内投与（10単位/kg）後の血中h-PTH（1-34）濃度も示した。本発明で得られた1-[2-（デシルチオ）エチル]アザシクロペンタン-2-オン1%を含む製剤は、対照製剤Bと比較して明らかにh-PTH（1-34）の吸収が優れ、筋肉内注射における血中濃度-時間面積（AUC）に比較して37%の吸収率を示した。このように、本発明におけるh-PTH（1-34）経鼻吸収性は、対照製剤Bと比較して著しく改善されたものであることが明らかであり、さらにその生物学的利用率が優れていることから筋肉投与に代わる有用な製剤である。

なお、第1図において、（ア）は、対照としてh-PTH（1-34）（10U/kg）を筋肉内投与したときの結果を示したものであり、（イ）は、実験例3の（a）で得られた製剤Aを経鼻投与した結果を示したものであり、（ウ）は、実験例3の（b）で得られた対照製剤Bを経鼻投与した結果を示したものである。

本発明の経鼻投与用PTH類乳剤の好ましい実施例を示すと以下のとおりである。

実施例 1

経鼻投与用乳剤 1ml 当り

- | | | |
|---|------------------------------------|---------------|
| ① | h-PTH（1-34） | 200 単位 |
| ② | 1-[2-（デシルチオ）エチル]
アザシクロペンタン-2-オン | 5 mg |
| ③ | グリチルリチン酸ジカリウム | 10 mg |
| ④ | グリセリン | 22 mg |
| ⑤ | パラオキシ安息香酸メチル | 1.2 mg |
| ⑥ | パラオキシ安息香酸プロピル | 0.3 mg |
| ⑦ | 水酸化ナトリウム | 適量 pH 5.5 に調整 |
| ⑧ | 注射用蒸留水 | 全量 1ml とした。 |

上記の組成を有する濃度に調製して得た。

また得られた乳剤を $0.22\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過して経鼻投与用バイアルに無菌的に充填することにより最終製剤を得た。

実施例 2

経鼻投与用乳剤 1 ml 当り

- | | | |
|---|---|------------------|
| ① | h-P T H (1 - 3 4) | 2 0 0 単位 |
| ② | 1 - [2 - (デシルチオ) エチル]
アザシクロペンタン-2-オン | 1 0 m g |
| ③ | グリチルリチン酸ジカリウム | 1 0 m g |
| ④ | グリセリン | 2 2 m g |
| ⑤ | パラオキシ安息香酸メチル | 1 . 0 m g |
| ⑥ | 水酸化ナトリウム | 適量 p H 5 . 5 に調整 |
| ⑦ | 注射用蒸留水 | 全量 1 m l とした。 |

上記の組成を有する濃度に調製して得た。

また得られた乳剤を $0.22\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過して経鼻投与用バイアルに無菌的に充填することにより最終製剤を得た。

実施例 3

経鼻投与用乳剤 1 ml 当り

- | | | |
|---|---|-----------|
| ① | h-P T H (1 - 3 4) | 1 0 0 単位 |
| ② | 1 - [2 - (デシルチオ) エチル]
アザシクロペンタン-2-オン | 1 0 m g |
| ③ | グリチルリチン酸ジカリウム | 1 0 m g |
| ④ | グリセリン | 2 1 m g |
| ⑤ | パラオキシ安息香酸メチル | 1 . 2 m g |

- ⑥ パラオキシ安息香酸プロピル 0.3 mg
- ⑦ 水酸化ナトリウム 適量 pH 5.5 に調整
- ⑧ 注射用蒸留水 全量 1 ml とした。

上記の組成を有する濃度に調製して得た。

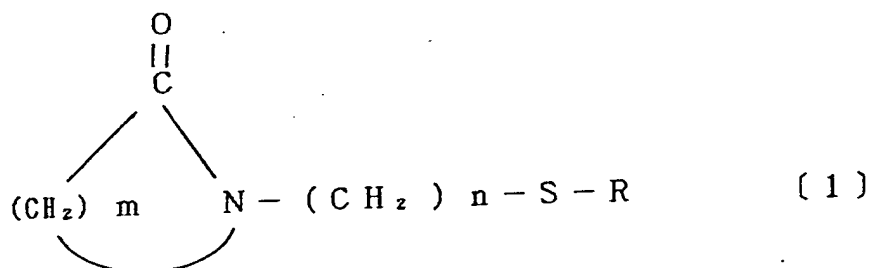
また得られた乳剤を0.22 μ mのメンブランフィルターで濾過して経鼻投与用バイアルに無菌的に充填することにより最終製剤を得た。

発明の効果

本発明のPTH類含有経鼻投与用乳剤は、吸収促進剤としてアザシクロアルカン誘導体を用いたことにより吸収性が良好となり、さらにその際グリチルリチン酸またはその無毒性塩を添加することにより均一かつ安定な乳剤を得ることができた。また得られた乳剤は従来の経鼻投与剤に比べて鼻粘膜に対して障害性が少なく、かつ鼻粘膜からの吸収性に優れ、良好な生体内利用率を示した。したがって本発明により、PTH類の経鼻投与用乳剤の実用化が可能となった。

請 求 の 範 囲

1. パラチロイドホルモン類を有効成分とし、少なくとも吸収促進剤として下記一般式〔1〕



(式中、Rはアルキル基、mは2～4の整数、nは1～15の整数を示す。但しnが1～3の場合にはRは炭素数が5～11のアルキル基を示す。)

で表されるアザシクロアルカン誘導体、グリチルリチン酸またはその無毒性塩および適宜な水を含有することを特徴とするパラチロイドホルモン類含有経鼻投与用乳剤。

2. 一般式〔1〕におけるRが炭素数10の直鎖状アルキル基であり、mが3、nが2である1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オンである請求の範囲1記載の乳剤。

3. パラチロイドホルモン類の含有量が、乳剤1ml当たり10～10,000単位である請求の範囲1記載の乳剤。

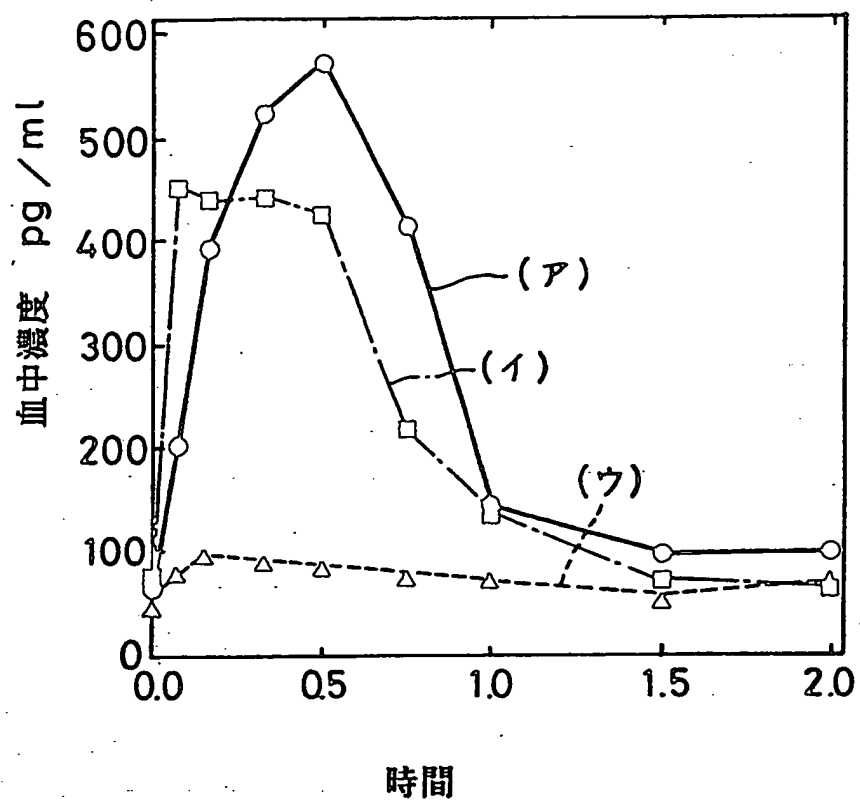
4. グリチルリチン酸またはその無毒性塩の含有量が、乳剤に対して0.1～5% (W/V) である請求の範囲1記載の乳剤。

5. アザシクロアルカン誘導体の含有量が、乳剤に対して0.1～10% (W/V) である請求の範囲1記載の乳剤。

6. ヒトパラチロイドホルモン(1-34)、グリチルリチン酸またはその無毒性塩および1-[2-(デシルチオ)エチル]アザシクロペンタン-2-オンを含有してなる請求の範囲1記載の乳剤。

1/1

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/01179

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁵ A61K37/24, 47/22, 47/26, 9/107		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A61K37/24, 9/109, 47/22, 47/26	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	JP, A, 62-238261 (Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.), October 19, 1987 (19. 10. 87), & EP, A, 241050 & WO, A, 87/06226 & AU, A, 8770207 & US, A, 4882359	1, 2
A	JP, A, 1-233230 (Goshi Kaisha Minophagen Seiyaku Honpo), September 19, 1989 (19. 09. 89), (Family: none)	1-6
A	JP, A, 2-28121 (Goshi Kaisha Minophagen Seiyaku Honpo), January 30, 1990 (30. 01. 90), (Family: none)	1-6
A	JP, A, 4-46129 (Toyo Jozo Co., Ltd.), February 17, 1992 (17. 02. 92), (Family: none)	1-6
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
November 26, 1992 (26. 11. 92)		December 22, 1992 (22. 12. 92)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP92/01179

I. 発明の口する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ³ A 61 K 37 / 24, 47 / 22, 47 / 26, 9 / 107		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	A 61 K 37 / 24, 9 / 107, 47 / 22, 47 / 26	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP. A. 62-238261 (久光製薬株式会社), 19. 10月. 1987 (19. 10. 87) & EP. A. 241050 & WO. A. 87/06226 & AU. A. 8770207 & US. A. 4882359	1, 2
A	JP. A. 1-233230 (合資会社 ミノファーゲン製 薬本館), 29. 9月. 1989 (29. 09. 89), (ファミリーなし)	1-6
A	JP. A. 2-28121 (合資会社 ミノファーゲン製薬 本館), 30. 1月. 1990 (30. 01. 90), (ファミリーなし)	1-6
A	JP. A. 4-46129 (東洋製造株式会社), 17. 2月. 1992 (17. 02. 92), (ファミリーなし)	1-6
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に抵触を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を昭示するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当該発明にとって明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 26. 11. 92	国際調査報告の発送日 22. 12. 92	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 松 浦 新 司	